

MH

PCT/EP 99 / 05145



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

09/743800

4

REC'D 01 SEP 1999

WIPO PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

98113519.7

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

DEN HAAG, DEN  
THE HAGUE, 02/08/99  
LA HAYE, LE



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung  
Sheet 2 of the certificate  
Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:  
Application no.: 98113519.7  
Demande n°:

Anmeldetag:  
Date of filing: 20/07/98  
Date de dépôt:

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):  
**Willex Biotechnology GmbH**  
**81675 München**  
**GERMANY**

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:  
**Neue Urokinase-Inhibitoren**

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:  
State:  
Pays:

Tag:  
Date:  
Date:

Aktenzeichen:  
File no.  
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:  
International Patent classification:  
Classification internationale des brevets:

**A61K31/495, A61K31/445, A61K31/195, C07D295/182**

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:  
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE  
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:

20-07-1998

EP98113519.7

DESC

20. Juli 1998

# PATENTANWÄLTE

European Patent Attorneys  
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN  
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN  
DIPL.-CHEM. B. HUBER  
DR.-ING. H. LISKA  
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL  
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM  
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS  
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER  
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG

POSTFACH 860 820  
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9  
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0

TELEX 5 22 621

TELEFAX (089) 4 70 50 68

eMail weickmann@compuserve.com

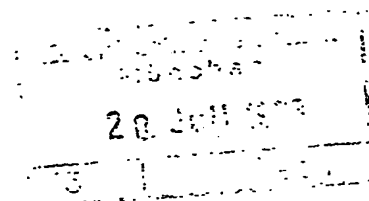
Unser Zeichen:

18061P EP/WWvo

Anmelder:

Wilex Biotechnology GmbH  
Grillparzer Straße 10 B

81675 München  
DE



---

Neue Urokinase-Inhibitoren

---

- 1 -

## Neue Urokinase-Inhibitoren

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidinophenylalanins als Urokinase-Inhibitoren insbesondere zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung.

10

Die Fähigkeit solider Tumoren zur Ausbreitung und Metastasierung in umgebendes Gewebe korreliert mit dem Abbau bzw. Umbau der extrazellulären Matrix (Tumorstroma) in der Umgebung der Tumorzelle, bzw. mit deren Fähigkeit zur Durchdringung der Basalmembran. Obwohl die (patho)biochemischen Zusammenhänge noch nicht endgültig aufgeklärt sind, kommen dem Plasminogenaktivator Urokinase (uPA) und dem Urokinaserezeptor (uPAR) eine zentrale Bedeutung zu. uPA vermittelt die proteolytische Spaltung von Plasminogen zu Plasmin. Plasmin wiederum ist eine Protease mit breitem Wirkspektrum, die Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibrin, Fibronectin, Laminin und das Proteingerüst der Proteoglykane direkt abzubauen vermag. Außerdem kann Plasmin "latente" Metalloproteasen und das inaktive Proenzym von uPA, pro-uPA, aktivieren.

15

20

25

30

Tumorzellen und nichtmaligne Zellen des Tumorstromas synthetisieren und sezernieren das enzymatisch inaktive Proenzym pro-uPA. Proteasen wie z.B. Plasmin oder die Kathepsine B und L spalten pro-uPA durch limitierte Proteolyse zur aktiven Serinprotease HMW-uPA (HMW = high molecular weight). pro-uPA und die aktive Protease HMW-uPA binden an den Zelloberflächenrezeptor uPAR (CD87). Plasmin(ogen) bindet ebenfalls an spezifische Rezeptoren auf der Plasmamembran der Tumorzelle, wodurch eine Fokussierung und Amplifikation der Plasminogenaktivierung in der direkten Umgebung der Tumorzelle erreicht wird. Invasiven Zellen ist somit die Möglichkeit gegeben,

- 2 -

die extrazelluläre Matrix abzubauen, ohne sich der für eine gerichtete Bewegung notwendigen Unterlagen durch Proteolyse zu entziehen.

In verschiedenen zellbiologischen Studien konnte gezeigt werden, daß dem zellassozierten Plasminogenaktivator-System innerhalb der kaskadenartigen Reaktionswege tumorassoziierter Proteolysesysteme ein besonderer Stellenwert zukommt (Wilhelm et al. (1994) The Urokinase/Urokinase receptor system: A new target for cancer therapy? In: Schmitt M., Graeff H., Kindermann G. (Hrsg): Prospects in Diagnosis and Treatment of Cancer. International Congress Series, Excerpta Medica 1050, Amsterdam, Elsevier 1994, pp145-156). An Kulturen humaner Kolonkarzinomzellen wurde beobachtet, daß deren Fähigkeit, eine extrazelluläre Matrix zu durchwandern, vom Sättigungsgrad der uPA-Rezeptoren mit aktivem uPA abhängig ist (Hollas et al., Cancer Res. 51 (1991), 3690-3695). Ebenfalls im Zellkulturmodell wurde eine Reduktion des invasiven Potentials von Zellen beobachtet, wenn die proteolytische Aktivität von uPA durch PAI-1 (Cajot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 6939-6943) oder PAI-2 (Baker et al., Cancer Res. 50 (1990), 4676-4684) gehemmt wurde. Ein vergleichbarer Effekt wurde bei Hemmung der Bindung von uPA an die Zelloberfläche durch Blockierung des Rezeptors mittels proteolytisch inaktiver uPA-Varianten erzielt (Cohen et al., Blood 78 (1991), 479-487; Kobayashi et al., Br. J. Cancer 67 (1993), 537-544). Auch die Transfektion epidermoider Karzinomzellen mit einem Plasmid, das ein Antisense-Transkript gegen einen Teil von uPAR exprimiert, führte durch Unterdrückung der uPAR-Synthese zur Verringerung der Invasivität dieser Zellen (Kook, EMBO J. 13 (1994), 3983-3991). Gegen uPA und PAI-1 gerichtete Antikörper reduzierten das invasive Potential von Lungenkrebszellen in vitro (Liu et al., Int. J. Cancer 60 (1995), 501-506).

Der Einfluß des Plasminogenaktivator-Systems auf den Metastasierungsprozeß konnte auch in Tumor-Tiermodellen belegt werden. So wurden die durch menschliche Karzinomzellen verursachte Bildung von Lungenmetasta-

- 3 -

sen in Hühnerembryos durch Zugabe von Antikörpern gegen uPA fast vollständig verhindert (Ossowski und Reich, Cell 35 (1983), 611-619). Metastasierende menschliche Karzinomzellen wurden mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das für eine proteolytisch inaktive, aber uPAR-bindende uPA-Mutante kodierte. Im Mausmodell zeigte sich, daß die Karzinomzellen, die inaktives uPA synthetisierten, nach Injektion im Vergleich zu den nichttransfizierten Zellen eine signifikant geringere Anzahl an Metastasen bildeten (Crowley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 5021-5025). Nach Verabreichung von uPA-Antisense Oligonukleotiden wurde darüber hinaus eine Inhibierung der intraperitonealen Ausbreitung von humanen Ovarialkarzinomzellen in Nacktmäusen beobachtet (Wilhelm et al., Clin. Exp. Metast. 13 (1995), 296-302).

In den letzten Jahren wurde die klinische Relevanz von Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2) für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht. Dabei erwies sich der uPA-Antigengehalt bei verschiedenen Tumoren (z.B. Brust, Eierstock, Magen, Lunge, Niere etc.) sowohl für das rezidivfreie Überleben als auch für das Versterben als ein starker Prognosefaktor (siehe beispielsweise Schmitt et al., J. Obstet. Gynaecol. 21 (1995), 151-165; Jaenicke et al., Breast Cancer Res. Treat. 24 (1993), 195-208; Kuhn et al., Gynecol. Oncol. 55 (1994), 401-409; Nekarda et al., Lancet 343 (1994), 117; Pedersen et al., Cancer Res. 54 (1994), 4671-4675). Ebenso korrelieren erhöhte Konzentrationen an uPAR in Lungen- (Pedersen et al., supra) und Brustkrebsgewebe (Duggan et al., Int. J. Cancer 61 (1995), 597-600; Ronne et al., Breast Cancer Res. Treat. 33 (1995), 199-207) sowie bei Magenkrebs sowohl im Tumorgewebe selbst (Heiss et al., J. Clin. Oncol. 13 (1995), 2084-2093) als auch bei den ins Knochenmark ausgestreuten Tumorzellen (Heiss et al., Nature Medicine 1 (1995), 1035-1039) mit einer schlechten Prognose.

Der Einsatz von sythetischen uPA-Inhibitoren bietet die Möglichkeit, die Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. Allerdings ist die Entwicklung spezifischer uPA-Inhibitoren mit Schwierigkeiten behaftet, da der Plasminogenaktivator von Gewebetyp (tPA) eine identische Spezifität für die Spaltung der Peptidbindung Arg560/Val561 von Plasminogen aufweist. In den meisten Fällen hemmen daher niedermolekulare uPA-Inhibitoren auch tPA und damit auch tPA-vermittelte Fibrinolyse. Außerdem muß gewährleistet sein, daß synthetische uPA Inhibitoren keine starke Hemmung von Plasmin zeigen.

Trotz dieser Einschränkungen sind einige Hemmstoffe bekannt, die eine gewisse Spezifität gegenüber uPA, jedoch geringe inhibitorische Kapazität besitzen, wie etwa Benzamidin- und  $\beta$ -Naphthamidin-Derivate, wobei die wirksamste Verbindung uPA mit  $K_i = 2,2 \mu\text{mol/l}$  hemmt (Stürzebecher und Markwardt, Pharmazie 33 (1978), 599), oder Amilorid mit einem  $K_i = 7 \mu\text{mol/l}$  (Vassalli und Belin, FEBS. Lett. 214 (1987), 187-191).

Eine weitere Klasse von bekannten uPA-Inhibitoren stellen 4-substituierte Benzothiophen-2-carboxamide mit einem  $K_i = 0,16 \text{ mmol/l}$  im Falle von Benzothiophen-623 dar (Towle et al., Cancer Res. 53 (1993), 2553-2559). Diese Hemmstoffe haben eine signifikant höhere Affinität für uPA im Vergleich zu tPA und Plasmin. Auch uPAR-gebundenes uPA wird mit hoher Effizienz gehemmt. Ein Nachteil dieser Substanzen liegt allerdings darin, daß die chemische Synthese kompliziert ist und kaum Möglichkeiten für die Modifizierung der Struktur vorhanden sind, bzw. bisher gezeigt werden konnte.

Die Entwicklung weiterer Hemmstoffe von uPA ist daher für die weitere Aufklärung der Rolle von uPA und uPAR bei verschiedenen Krankheiten, speziell bei der Tumorausbreitung und Metastasierung, von großem Nutzen.

$N\alpha$ -Arylsulfonyl- und  $N\alpha$ -Arylsulfonyl-amino-acyl-Derivate des 3-Amidinophenylalanins sind als selektive Hemmstoffe von Thrombin (Markwardt et al.,

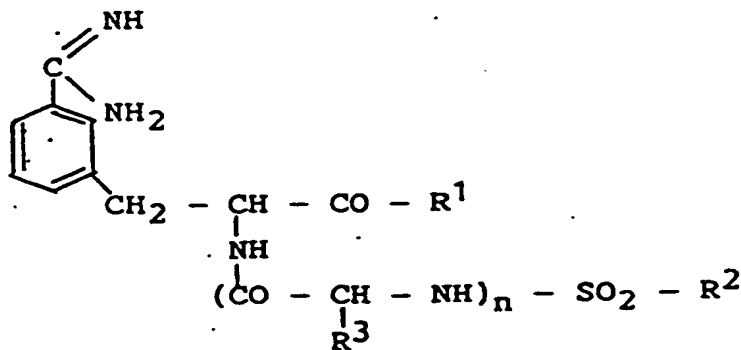
- 5 -

Thromb. Res. 17 (1980), 425-431) bzw. von Gerinnungsfaktor Xa (Stürzebecher et al., Thromb. Res. 54 (1989), 245-252) bekannt. Auch in WO 92/08709 und WO 94/18185 wird die Verwendung von Amidinophenylalaninderivaten als Hemmstoffe für die Blutgerinnung, insbesondere als Hemmstoffe für Thrombin, offenbart.

Intensiv wurden Piperidide und Piperazide des 3-Amidinophenylalanins untersucht, unter denen auch Leitstrukturen zur Hemmung fibrinolytischer Enzyme gefunden wurden (Stürzebecher et al., J. Enzyme Inhibition 9, 87-99, 1995; Stürzebecher et al., J. Med. Chem. 40, 3091-3099, 1997). Während bei Stürzebecher et al. (1995) nur eine Hemmung von Thrombin, Faktor Xa, Plasmin und Trypsin beschrieben ist, finden sich bei Stürzebecher et al. (1997) auch Angaben zur Hemmung von uPA. Bei  $\alpha$ -2-Naphthylsulfonyl-,  $\alpha$ -2-(2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-yl)sulfonyl- und  $\alpha$ -2-Campher-10-yl-sulfonyl-substituierten 3-Amidinophenylalanin-piperaziden wird für uPA ein  $K_i$ -Wert von 28 bis 140  $\mu\text{mol/l}$  gefunden, der um drei Größenordnungen höher als die Inhibitionskonstante für Thrombin ist. Somit konnte nicht davon ausgegangen werden, daß 3-Amidinophenylalaninderivate als Urokinaseinhibitoren geeignet sind.

Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, daß an Position 2 mit einem Phenylrest substituierte 3-Amidinophenylalaninderivate selektive und in vivo wirksame Hemmstoffe von uPA darstellen.

Die vorliegende Erfindung betrifft von 3-Amidinophenylalanin abgeleitete neue Urokinase-Inhibitoren der allgemeinen Formel I,





- 6 -

die als Racemate sowie als L- bzw. D-konfigurierte Verbindungen vorliegen und in denen

R1 (a) OH oder OR<sup>4</sup> ist, wobei R<sup>4</sup> ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituirtes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkyl oder Aralkyl, z.B. Benzyl oder Phenylethyl ist,

R<sup>5</sup>

(b) eine Gruppe der Formel -N darstellt, in welcher

R<sup>6</sup>

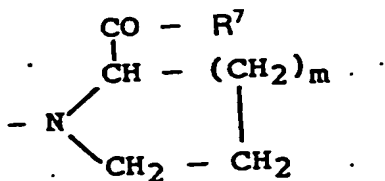
(i) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> H sind,

(ii) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituirtes verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, Aralkyl, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, oder C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> Cycloalkyl ist,

(iii) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> jeweils unabhängig ein gegebenfalls z.B. mit Hydroxyl oder/und Halogen substituirtes, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl sind oder

(iv) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> -NH<sub>2</sub> oder eine insbesondere mit Aryl oder Heteroaryl substituierte Aminogruppe ist,

(c) eine Gruppe der Formel

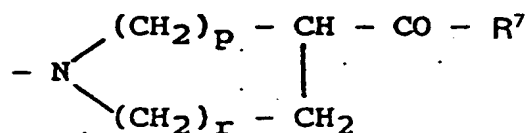


darstellt, in welcher m die Zahl 1 oder 2 bezeichnet, und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls z.B. mit einem Hydroxyl-, Carboxyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl- oder Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, substituiert sind, wobei die Gruppe (c) racemisch oder D- bzw. L-konfiguriert ist,

- 7 -

und  $R^7$  die Bedeutung von  $R^1$  in den Ziffern (a), (b) und (f) aufweist,

(d) eine Gruppe der Formel



darstellt, in welcher  $p = r = 1$ ,  $p = 1$  und  $r = 2$  oder  $p = 2$  und  $r = 1$  sind und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls z.B. mit einem Hydroxyl-, Carboxyl-,  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl- oder Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, substituiert sind, und  $R^7$  die Bedeutung von  $R^1$  in Ziffer (a), (b) und (f) aufweist,

(e) eine Piperidylgruppe darstellt, die gegebenenfalls in einer der Stellungen 2, 3 und 4 z.B. mit einem  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl-,  $C_1$ - $C_3$ -Alkoxy- oder Hydroxylrest substituiert ist, wobei gegebenenfalls an die heterocycloaliphatischen Ringe der Formeln (c), (d), (e) ein weiterer aromatischer oder cycloaliphatischer Ring, vorzugsweise Phenyl oder Cyclohexyl, in 2,3 oder 3,4 Stellung, bezogen auf das Heteroatom, ancondensiert ist,

(f) eine Gruppe der Formel



darstellt, in welcher  $R^8$

(i) einen gegebenenfalls z.B. mit  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl,  $C_1$ - $C_3$ -Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl- oder Arylrest, wie z.B. Phenyl, p-Halogenphenyl, Naphthyl,

- 8 -

- (ii) einen gesättigten oder ungesättigten, verzweigten oder unverzweigten C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxyrest oder
- (iii) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Phenoxy- bzw. Benzylloxycarbonylrest bedeutet,
- (g) einen Acylrest der Formel -COX darstellt, wobei X
- (i) H, einen gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten, unverzweigten oder verzweigten Alkylrest, vorzugsweise einen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylrest, insbesondere Methyl,
- (ii) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Aryl- oder Heteroarylrest, wie z.B. Phenyl, p-Halogenphenyl, Thienyl oder
- (iii) einen gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Cycloalkylrest, vorzugsweise einen C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-Cycloalkylrest bedeutet,
- (h) einen Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, darstellt, in dem der aromatische Rest gegebenenfalls z.B. mit einem Halogenatom, einer C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy-, Hydroxy-, Cyano-, Carboxyl-, Sulfonyl- oder Nitrogruppe substituiert ist,
- (i) einen Carbonsäureamidrest der Formel -CONR'R'', einen Thiocarbonsäureamidrest -CSNR'R'' oder einen Essigsäureamidrest -CH<sub>2</sub>-CONR'R'' darstellt, wobei
- (i) R' und R'' H sind,
- (ii) R' und R'' jeweils unabhängig C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl sind,

- 9 -

- (iii) R' H ist und R" C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl ist,  
(iv) R' H ist und R" Aryl, z.B. Phenyl, ist oder  
(v) R' und R" mit dem Stickstoffatom einen heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weitere Heteroatom z.B. N, O oder/und S tragen kann, bilden,

(j) einen SO<sub>2</sub>-Y-Rest darstellt, in dem Y

(i) ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, vorzugsweise Methyl, Trifluormethyl, Trichlormethyl,

(ii) ein gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes Aryl oder Heteroaryl, wie z.B. Phenyl, 4-Methyl-phenyl, 2,4,6-Trimethyl-phenyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenyl, 4-Methoxy-2,3,6-Trimethyl-phenyl, 2,2-Dimethyl-6-methoxy-chromanyl, 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chromanyl, Anthrachinonyl, Naphthyl oder Chinolyl, bzw. O-Aryl, vorzugsweise O-Phenyl, oder O-Heteroaryl oder

(iii) -NR'R" ist, wobei R' und R" jeweils unabhängig H oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl bedeuten,

(k) einen cycloaliphatischen Ring mit 5 bis 8 C-Atomen darstellt, der ggf. z.B. mit einer C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy-, Halogen-, Hydroxyl- oder/und Oxogruppe substituiert ist,

(l) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Heteroarylrest, wie z.B. Pyridyl oder Pyrimidyl, oder heterocycloaliphatischen Rest, beispielsweise N-Methylpiperidyl darstellt,

- 10 -

(m) einen funktionalisierten Alkylrest der Formel  $-(CH_2)_n-X$  darstellt, wobei die Alkylkette unverzweigt oder verzweigt ist,  $n = 1$  bis 8 bedeutet und der funktionelle Rest X

- (i) eine Hydroxylgruppe darstellt, deren H-Atom gegebenenfalls durch eine  $C_1-C_4$ -Alkyl-, Aralkyl-, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, Aryl-, z.B. Phenyl,  $C_1-C_4$ -Hydroxyalkyl- oder Acylgruppe CO-Alkyl, ( $C_1-C_6$ ), substituiert ist,
- (ii) ein Halogenatom bedeutet,
- (iii) eine tertiäre Aminogruppe der Formel  $-N(Alk)_2$  darstellt, wobei die Alkylgruppen 1 bis 3 C-Atome sowie vorzugsweise die gleiche Bedeutung besitzen und das Stickstoffatom gegebenenfalls einem heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom, z.B. N, O oder/und S tragen kann, angehört,

$R^2$  einen gegebenenfalls z.B. mit  $C_1-C_6$ -Alkyl,  $C_1-C_3$ -Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Phenylrest, wie beispielsweise Phenyl, 4-Methyl-phenyl, 2,4,6-Trimethyl-phenyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenyl, 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenyl darstellt,

$R^3$  H oder verzweigtes bzw. unverzweigtes  $C_1-C_4$ -Alkyl ist und n 0 oder 1 bedeutet.

Die Verbindungen können auch als Salze vorzugsweise als physiologisch verträgliche Säuresalze, z.B. als Salze von Mineralsäuren, besonders bevorzugt als Hydrochloride, oder als Salze von geeigneten organischen Säuren vorliegen.

Von den in den allgemeinen Ansprüchen definierten Verbindungen sind solche, bei denen  $R^1$  einer Gruppe der Formeln (b), (d) und (f) entspricht,  $R^2$

- 11 -

einen einfach, zweifach oder dreifach alkylsubstituierten Phenylrest, insbesondere einen 2,4,6-substituierten Phenylrest, z.B. einen 2,4,6-Triisopropylphenyl-Rest darstellt und  $n = 0$  ist, von besonderer Bedeutung.

5 Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in prinzipiell bekannter Weise, wie z.B. in WO 92/08709 und WO 94/18185 beschrieben, hergestellt und auf ihre biologische in vitro Aktivität gesetzt werden.

(L)-, (D)- oder (D,L)-3-Cyanphenylalanin-methylester-hydrochlorid wird mit  
10 einem entsprechenden Sulfochlorid oder einer sulfonylierten Aminosäure bzw. deren Halogenid in Gegenwart einer Base zu einer Verbindung der allgemeinen Formel I mit Cyanfunktion, in der  $R^1 = OCH_3$  ist und  $R^2$  sowie  $R^3$  und  $n$  den in den allgemeinen Ansprüchen definierten Bedeutungen entspricht, umgesetzt. Durch milde saure oder alkalische Hydrolyse sind  
15 daraus die Verbindungen der allgemeinen Formel I mit Carbonsäurestruktur ( $R^1 = -OH$ ) erhältlich, deren Veresterung mit einem entsprechenden Alkohol unter säurekatalytischen Bedingungen zu Verbindungen der allgemeinen Formel I führt, wobei  $R^1 = (a)$  bedeutet. Nach einem in der Peptidchemie üblichen Verfahren, z.B. DCC-Verfahren in Gegenwart von HOBt, sind durch  
20 Umsetzung der Carbonsäuren der allgemeinen Formel I ( $R^1 = -OH$ ) mit einem Nukleophil der Strukturen (b), (e) und (f) die Verbindungen mit entsprechendem  $R^1$  der allgemeinen Formel I vorstellbar. Für die Synthese von Verbindungen mit  $R^1 = (c)$  und (d) werden zunächst die Carbonsäuren der allgemeinen Formel I mit  $R^1 = OH$  mit cycloaliphatischen Aminosäureestern der Strukturen (c) und (d), wobei  $R^7$  vorzugsweise  $-OCH_3$  bzw.  $-OC_2H_5$   
25 bedeutet, umgesetzt, die erhaltenen Carbonsäureester unter milden sauren oder alkalischen Bedingungen zu den entsprechenden Carbonsäuren hydrolysiert, die nachfolgend in bereits beschriebener Weise verestert oder mit Nukleophilen der Struktur (b), (e) und (f) umgesetzt werden können, wobei Verbindungen der allgemeinen Formel I mit  $R^1 = (c)$  sowie (d) und  $R^7$   
30  $= (a)$ , (b), (e) und (f) erhalten werden.

- 12 -

Die Zielverbindungen der allgemeinen Formel I mit Amidinstruktur sind aus den Cyanverbindungen in bekannter Weise erhältlich, wobei in der Regel durch Addition von  $H_2S$  an die Cyangruppe zunächst die Thioamide erhalten werden, die durch S-Methylierung mit Methyljodid in die Thioimidoester und  
5 anschließend durch Behandlung mit Ammoniumacetat in alkoholischer Lösung in die Amidinoverbindungen überführt werden. Außerdem können gegebenenfalls aus den Cyanverbindungen mit Methanol oder Ethanol in Gegenwart von HCl-Gas und in bestimmten Fällen eines inerten Lösungsmittels die entsprechenden Imidoesterhydrochloride dargestellt werden, deren Umsetzung in alkoholischer Ammoniaklösung zu den Amidinoverbindungen führt.

Die erfindungsgemäßen Urokinaseinhibitoren können gegebenenfalls zusammen mit mindestens einem geeigneten pharmazeutischen Hilfs- oder  
15 Trägerstoff zur Herstellung von oral, subkutan oder intravenös verabreichbaren Arzneimitteln zur Tumorbekämpfung oder in der Diagnostik verwendet werden. Ebenfalls möglich ist die Verabreichung in Kombination mit anderen Wirkstoffen, z.B. anderen Urokinaseinhibitoren wie etwa Antikörpern oder/und Peptiden.

20 Die Arzneimittel zur Tumorbekämpfung bei Menschen und Tieren können topisch, oral, rektal oder parenteral, z.B. subkutan oder intravenös, in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen, wie Pflastern, verabreicht werden.

25 Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Verbindung der Formel (I) um  $N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid-hydrochlorid bzw. um das L-Entantiomere davon oder um ein pharmazeutisch verträgliches Salz dieser Verbindungen. Diese  
30 Substanzen haben ein gutes Löslichkeitsverhalten. In Trispuffer (pH 7,3) sind sie bis zu einer Konzentration von  $5 \times 10^{-5}$  mol/l löslich. Durch Zusatz

- 13 -

von 5% Ethanol steigt die Löslichkeit auf  $2 \times 10^{-4}$  mol/l und bei Zusatz von 5% DMSO auf  $10^{-3}$  mol/l.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind in der Lage, hocheffizient das Wachstum oder/und die Ausbreitung von malignen Tumoren zu hemmen, z.B. die Tumorausbreitung beim Pankreaskarzinom, das Tumorwachstum des Mammakarzinoms sowie die Metastasierung von Tumoren. Dabei können die uPA-Inhibitoren gegebenenfalls zusammen mit anderen Antitumormitteln oder mit anderen Behandlungsarten, z.B. Bestrahlung oder chirurgischen Eingriffen, eingesetzt werden. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Inhibitoren auch für andere uPA-assoziierte Erkrankungen wirksam (z.B. bei der Verhinderung der Blasenbildung bei der Hauterkrankung Pemphigus vulgaris).

Erfindungsgemäße uPA Inhibitoren sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß sie einen mindestens zweifach, vorzugsweise mindestens 5-fach und besonders bevorzugt mindestens 10-fach geringeren  $K_i$ -Wert für uPA gegenüber tPA aufweisen. Weiterhin ist bemerkenswert, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen die Blutgerinnung nur geringfügig beeinflussen, da sie für eine effektive Hemmung von Thrombin und Faktor Xa zu hohe  $K_i$ -Werte haben.

Die Erfindung soll an den folgenden Beispielen näher erläutert werden.



**Beispiele****1.  $N\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid-hydrochlorid**

5

**1.1  $N\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin-methylester**

10

5 g (L)-3-Cyanphenylalanin-methylester wurden in 100 ml Dioxan suspendiert, 4,45 ml N-Methylmorpholin (NMM) zugefügt und 30 min gerührt. Nach Zugabe von 5,97 g 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfochlorid in fester Form wurde 3 Tage gerührt, danach ausgefallenes NMM-HCl abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt über Kieselgel (KG) 60 (Chloroform) gereinigt. Ausbeute: 8,34 g Sirup (90%).

15

**1.2  $N\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin**

20

8,34 g der Verbindung 1.1 wurden in einer Mischung aus je 50 ml Essigsäure und 1 N Salzsäure 8 Std. unter Rückfluß erhitzt, nach dem Erkalten 2x mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten Ethylacetatlösungen über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Nach Reinigung über KG 60 (Chloroform) wurden 5,8 g eines festen Produktes erhalten (72%).

25

**1.3  $N\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid**

30

5,7 g der Verbindung 1.2 wurden in 100 ml Tetrahydrofuran (THF) gelöst, auf 0°C abgekühlt, 2,22 g  $\alpha$ -Hydroxybenzotriazol (HOBt), 2,82 g Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zugefügt und 30 min gerührt. Nach Zugabe von 3,94 g 1-Ethoxycarbonyl-piperazin in 30 ml THF

- 15 -

wurde über Nacht gerührt, danach ausgefallenes Dicyclohexylurea (DCU) abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt über KG 60 (Chloroform) gereinigt. Ausbeute: 7,1 g eines amorphen Pulvers (96%).

5

#### 1.4 **N $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid Hydrochlorid**

10

15

20

25

7,1 g der Verbindung 1.3 wurden in 30 ml Pyridin gelöst, 30 Tropfen Triethanolamin (TEA) zugefügt, 10 min ein kräftiger Schwefelwasserstoffstrom eingeleitet und 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Ethylacetat gelöst, die organische Phase mit 1 N Salzsäure und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. 7,2 g des auf diese Weise erhaltenen Thioamids wurden in 250 ml Aceton gelöst, die Lösung mit 17 g Methyljodid versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur unter Lichtschutz stengelassen. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert, das Thioimidester-hydroiodid (8,5 g) in 50 ml Methanol gelöst, 1,9 g Ammoniumacetat zugefügt und der Ansatz 4 Std. bei 60°C erwärmt. Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt wurde über Sephadex LH20 (Methanol) gereinigt. Das auf diese Weise erhaltene Amidin-hydroiodid wurde über Ionenaustauscher (Amberlite IRA-420) in das Hydrochlorid übergeführt. Ausbeute: 5,3 g eines amorphen Pulvers (69%).

- 16 -

2.  **$\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsufonyl-(D,L)-3-amidinopenyl-alanyl-nipecotinsäure-benzylamid Hydrochlorid**

2.1  **$\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure-ethylester**

5

10

15

4,56 g  $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanin (aus (D,L)-3-Cyanphenylalanin-methylester-hydrochlorid und dem entsprechenden Sulfochlorid analog 1.1 und 1.2 dargestellt), 1,5 g HOBt und 2,42 g DCC wurden in 50 ml DMF gelöst, 1 Std. gerührt und danach 2,36 g Nipecotinsäure-ethylester zugefügt. Nach Rühren über Nacht wurde ausgefallenes DCU abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und zur Kristallisation stehengelassen. Der gebildete Niederschlag wurde abgesaugt, mit Methanol gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 4,46 g (75%).

2.2  **$\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsufonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure**

20

25

30

4,4 g des vorher beschriebenen Ethylesters wurden in einer Mischung aus 35 ml Essigsäure und 25 ml 1 N HCl 2 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von 10 ml Wasser wurde zum Erkalten stehengelassen, wobei sich ein wachsartiges Produkt abschied. Nach Abgießen des Lösungsmittels wurden 200 ml Wasser zugesetzt, längere Zeit kräftig gerührt und die erhaltene feste Substanz abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 3,84 g (92%).

- 17 -

### 2.3 $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure-benzylamid

2,28 g der vorher beschriebenen Verbindung 0,6 g HOBt und 0,97 g DCC wurden in 20 ml DMF gelöst, 1 Std. gerührt, anschließend 0,6 g Benzylamin zugefügt und weiter über Nacht gerührt. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen DCU wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Methanol gelöst und die Lösung in 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung/Eis gegossen. Nach 1 Std. wurde der gebildete Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 2,48 g (94%).

### 2.4 $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-amidino-phenylalanyl-nipecotinsäure-benzylamid Hydrochlorid

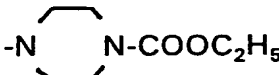

2,4 g der Verbindung 2.3 wurden in 30 ml Pyridin gelöst, 30 Tropfen TEA zugefügt, in die Lösung 10 min Schwefelwasserstoff eingeleitet und der Ansatz 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit 1 N HCl ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit gesättigter Kochsalzlösung und Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel abdestilliert. 2,38 g des auf diese Weise erhaltenen Thioamids wurden in 100 ml Aceton gelöst, die Lösung mit 6,5 g Methyljodid versetzt und 20 Std. bei Raumtemperatur unter Lichtschutz stehengelassen. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert, das Thioimidonester-hydroiodid in 50 ml Methanol gelöst, 0,5 g Ammoniumacetat zugegeben und der Ansatz 4 Std. bei 60°C im Wasserbad erwärmt. Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt konnte über KG 60 gereinigt werden. Die Elution erfolgte zunächst mit Chloroform, danach mit Chloroform/Methanol 9:1. Das so gereinigte Amidinhydroiodid wurde über Ionenaustauscher (Amberlite IRA-420) in das

- 18 -

Hydrochlorid übergeführt. Ausbeute: 1,45 g eines amorphen Pulvers (56%).

Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte massenspektrometrisch, eine Reinheitsprüfung erfolgte mittels DC und HPLC.

### 3. In vitro Hemmung von Urokinase durch ausgewählte Verbindungen der Formel I

Konfiguration	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	n	K <sub>i</sub> , µmol/l
L		TIPP	0	0,41
D,L		TIPP	0	0,61

Abkürzungen: TIPP - 2,4,6-Triisopropylphenyl

#### Bestimmung der Hemmwirkung

Zur Bestimmung der Inhibitoraktivität wurden 200 µl Tris-Puffer (0,05 mol/l, den Inhibitor enthaltend, 0,154 mol/l NaCl, 5% Ethanol pH 8,0), 25 µl Substrat (Pefachrome UK oder Bz-βAla-Gly-Arg-pNA in H<sub>2</sub>O; Pentapharm Ltd., Basel, Schweiz) und 50 µl sc-Urokinase (Ribosepharm GmbH, Haan, Deutschland) bei 25°C inkubiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels Microplate Reader (MR 5000, Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bestimmt. Die K<sub>i</sub>-Werte wurden nach Dixon durch lineare Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die K<sub>i</sub>-Werte sind das Mittel aus mindestens 3 Bestimmungen, die Standardabweichung lag unter 25%.

- 19 -

4. In vitro Hemmung verschiedener Serinproteasen vom Trypsin-Typ durch (N $\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid (uPA-Inhibitor) und N $\alpha$ -2-Naphthyl-formyl-3-amidinophenylalanin-N'-methylpiperazid (Naphthyl-Derivat) als Vergleich

Enzym	K <sub>i</sub> [ $\mu$ mol/l]	
	uPA-Inh.	Naphthyl-Der.
Urokinase	0,41	150
Plasmin	0,39	55
Sc-tPA	4,9	430
Thrombin	0,27	0,036
Faktor Xa	1,7	30
Faktor XIIa	13	1000
Plasma-Kallikrein	7,2	85
Glandulär-Kallikrein	> 1000	> 1000
Trypsin	0,037	1,3
Tryptase	6,3	33

Die Bestimmung der Hemmwirkung für die verwendeten Enzyme erfolgte nach dem in Beispiel 3 beschriebenen Prinzip.

Aus den oben angegebenen Werten ist ersichtlich, daß der erfindungsgemäße Urokinasehemmstoff uPA-Inhibitor überraschenderweise einen um mehr als den Faktor 10 kleineren K<sub>i</sub>-Wert für Urokinase als für Einzelketten tPA (Sc-tPA) aufweist. Somit eignen sich die erfindungsgemäßen Substanzen als selektive Urokinaseinhibitoren. Zum Vergleich ist die Inhibitoraktivität des Naphthyl-Derivats angeführt, das eine signifikant geringere in vitro Anti-uPA-Aktivität aufweist.

- 20 -

## 5. Bestimmung der Zytotoxizität

Für die Bestimmung der Zellproliferation/Zytotoxizität wurde ein kommerziell erhältlicher Test eingesetzt (Promega), welcher auf der zellulären Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes beruht. Das aus dieser Reaktion resultierende farbige Produkt kann mittels eines ELISA-Spektrometers (ICN-Flow) quantifiziert werden. Der synthetische Inhibitor (offene Kreise) hatte gegenüber dem Lösungsmittel (geschlossene Kreise) alleine keinen Einfluß auf das Zellwachstum humaner Ovarialkarzinomzellen OV-MZ-6 (Figur 1). Somit ist der erfindungsgemäße uPA-Inhibitor in pharmakologisch wirksamen Konzentrationen bis 40  $\mu$ M nicht zytotoxisch.

## 6. Inhibierung des Abbaus einer Fibrin-Matrix durch humane Mammakarzinomzellen

Zur Untersuchung der Fähigkeit von Tumorzellen eine extrazelluläre Matrix abzubauen, wurde ein Fibrinmatrixabbau-Test entwickelt und verwendet. Je größer die proteolytische Aktivität der Tumorzellen, um so höher ist die Konzentration der Fibrinabbauprodukte im Matrixüberstand. Der Matrixabbaukapazität entspricht der Konzentration der Fibrinabbauprodukte, welche mittels ELISA (D-Dimer) ermittelt werden.

Die Fibringlele wurden in 24 Well Kulturplatten aus 200  $\mu$ l Fibrinogen (50 mg/ml) in PBS (pH 7,4) durch 50  $\mu$ l Thrombin (10 U/ml) und 50  $\mu$ l  $\text{CaCl}_2$  (150 mM) pro Well nach Inkubation für 30 min bei 37°C gebildet.  $2 \times 10^5$  Mammakarzinomzellen wurden auf diese Fibrinmatrix in 1 ml DMEM Kulturmedium, plus 10% fetalem Kälberserum und 2  $\mu$ g Glu-Plasminogen ausgesät und 4 h lang inkubiert. Danach wurde der Überstand zentrifugiert, um Zellen zu entfernen, und die Fibrinabbauprodukte mittels ELISA quantifiziert. Die Zugabe des erfindungsgemäßen Inhibitors (A) in unterschiedlichen Konzentrationen führte zu einer signifikanten Inhibierung des Matrixabbaus durch Mammakarzinomzellen im Vergleich zu dem Naphthyl-

Derivat (B), das keine Hemmung des Fibrinabbaus durch Mammakarzinomzellen zeigt (Figur 2).

5      **7.      In vivo Test des uPA Inhibitors auf Tumorausbreitung, Tumorwachstum und Metastasierung**

**A)      Brustkrebsmodell**

10      10-25 mm<sup>3</sup> Rattenbrustkrebs-Tumorfragmente wurden in Ratten submammlär transplantiert (Tag 0). Die Behandlung der Tiere wurde 24 h nach der Tumorinokulation intraperitoneal begonnen. Jede Gruppe bestand aus 8 Tieren. Die Kontrollgruppe erhielt nur Injektionslösung (100 µl einer 10% Ethanol in Saline Lösung). Der Vergleichsgruppe des Naphthyl-Derivats (B) und der Therapiegruppe des erfindungsgemäßen uPA-Inhibitors (A) wurden in der oben  
15      genannten Lösung eine Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht täglich i.p. verabreicht. Das Naßgewicht der Organe wurde direkt nach Opferung der Tiere bestimmt. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt.

20      Die Behandlung mit uPA-Inhibitor (A) führte zu einer signifikanten Reduktion des Primärtumorgewichtes sowie der axillären Lymphknoten (p=0,003 bzw. p = 0,005) im Vergleich mit dem Naphthyl-Derivat (B) und Kontrollgruppen ohne Inhibitor (Fig. 3 und 4). Die Gewichte  
25      von Lunge, Leber, Niere und Milz bei den mit dem uPA-Inhibitor behandelten Tieren waren unverändert gegenüber den Kontrolltieren.

**B)      Pankreaskarzinommodell**

30      Rattenpankreas-Tumorfragmente wurden in Ratten subkutan transplantiert. Die Durchführung der Behandlung sowie Zusammensetzung der Therapiegruppen war identisch wie unter A).



- 22 -

Wie aus Figur 5 ersichtlich ist, findet man beim erfindungsgemäßen uPA-Inhibitor (offene Kreise) gegenüber dem Naphthyl-Derivat (geschlossene Kreise) und der Kontrollgruppe (Dreiecke) eine signifikante Verringerung des Tumorgewichts und eine Verminderung des Wachstums bei den entstehenden Ratten-Pankreaskarzinom.

### C) Behandlung humaner Brustkrebszellen in der Nacktmaus

Um die in vivo Effizienz des Inhibitors zur Hemmung des Tumorstwachstums humaner Mammakarzinomzellen zu testen (MDA-BA-231), wurden  $6 \times 10^6$  Zellen subcutan in die rechte Flanke von Balb/c Nacktmäusen (4-6 Wochen alt) injiziert. Die Tumorzellen wurden vor Inokulation mit dem synthetischen uPA-Inhibitor vorinkubiert. Nach 24 h wurden die Mäuse mit einer Dosis von 1,2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal wie unter A) beschrieben zweimal wöchentlich behandelt. Die Tumorgroße wurde wöchentlich durch Messung der zwei größten Durchmesser bestimmt.

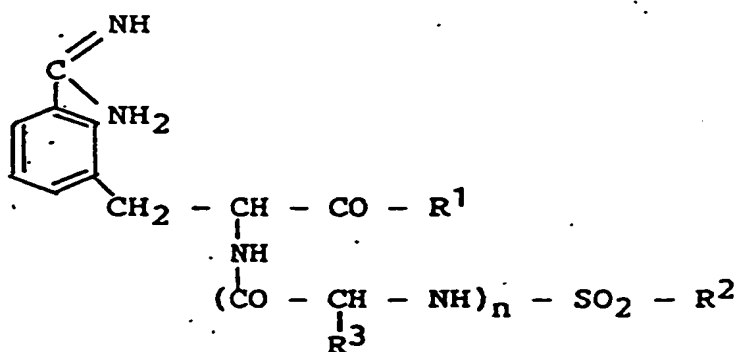
Wie aus Figur 6 ersichtlich ist, nimmt das Tumolvolumen bei der Verabreichung des uPA-Inhibitors (offene Kreise) signifikant langsamer zu als in der Kontrollgruppe (geschlossene Kreise) wo Ethanol in Saline verabreicht wurde.

- 23 -

## Ansprüche

26 JUL 1998

## 1. Verwendung von Verbindungen der Formel I



die als Racemate sowie als D- oder L-konfigurierte Verbindungen vorliegen und in denen

15

R1 (a) OH oder OR<sup>4</sup> ist, wobei R<sup>4</sup> ein gegebenenfalls substituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkyl oder Aralkyl ist,

20

(b) eine Gruppe der Formel -N  $\begin{matrix} \text{R}^5 \\ \text{R}^6 \end{matrix}$  darstellt, in welcher

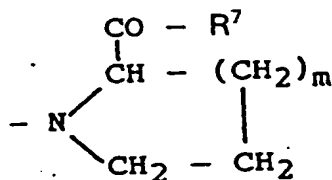
25

- (i) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> H sind,
- (ii) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> ein gegebenenfalls substituiertes verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, Aralkyl, oder C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> Cycloalkyl ist,
- (iii) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> jeweils unabhängig ein gegebenenfalls substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl sind oder
- (iv) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> -NH<sub>2</sub> oder eine insbesondere mit Aryl oder Heteroaryl substituierte Aminogruppe ist,

30

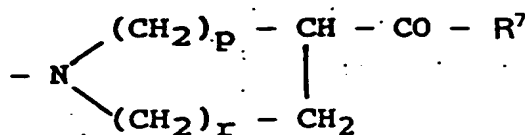
- 24 -

(c) eine Gruppe der Formel



darstellt, in welcher m die Zahl 1 oder 2 bezeichnet, und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls substituiert sind, wobei die Gruppe (c) racemisch oder D- bzw. L-konfiguriert ist, und  $\text{R}^7$  die Bedeutung von  $\text{R}^1$  in den Ziffern (a), (b) und (f) aufweist,

(d) eine Gruppe der Formel

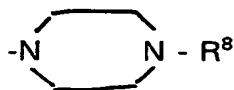


darstellt, in welcher  $p = r = 1$ ,  $p = 1$  und  $r = 2$  oder  $p = 2$  und  $r = 1$  sind und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls substituiert sind, und  $\text{R}^7$  die Bedeutung von  $\text{R}^1$  in Ziffer (a), (b) und (f) aufweist.

(e) eine Piperidylgruppe darstellt, die gegebenenfalls in einer der Stellungen 2, 3 und 4 substituiert ist, wobei gegebenenfalls an die heterocycloaliphatischen Ringe der Formeln (c), (d), (e) ein weiterer aromatischer oder cycloaliphatischer Ring in 2,3 oder 3,4 Stellung, bezogen auf das Heteroatom, ankondensiert ist,

- 25 -

(f) eine Gruppe der Formel



5

darstellt, in welcher  $\text{R}^8$ 

10

- (i) einen gegebenenfalls substituierten  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -Alkyl- oder Arylrest,
- (ii) einen gesättigten oder ungesättigten, verzweigten oder unverzweigten  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -Alkoxyrest oder
- (iii) einen gegebenenfalls substituierten Phenoxy- bzw. Benzyloxycarbonylrest bedeutet,

15

(g) einen Acylrest der Formel  $\text{-COX}$  darstellt, wobei X

- (i) H, einen gegebenenfalls substituierten unverzweigten oder verzweigten Alkylrest,
- (ii) einen gegebenenfalls substituierten Aryl- oder Heteroarylrest, oder
- (iii) einen gegebenenfalls substituierten Cycloalkylrest bedeutet,

20

(h) einen Aralkylrest darstellt, in dem der aromatische Rest gegebenenfalls substituiert ist,

25

(i) einen Carbonsäureamidrest der Formel  $\text{-CONR'R''}$ , einen Thiocarbonsäureamidrest  $\text{-CSNR'R''}$  oder einen Essigsäureamidrest  $\text{-CH}_2\text{-CONR'R''}$  darstellt, wobei

30

- (i)  $\text{R'}$  und  $\text{R''}$  H sind,
- (ii)  $\text{R'}$  und  $\text{R''}$  jeweils unabhängig  $\text{C}_1\text{-C}_4$ -Alkyl sind,
- (iii)  $\text{R'}$  H ist und  $\text{R''}$   $\text{C}_1\text{-C}_4$ -Alkyl ist,
- (iv)  $\text{R'}$  H ist und  $\text{R''}$  Aryl ist, oder

- 26 -

- (v) R' und R" mit dem Stickstoffatom einen heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom tragen kann, bilden,
- 5 (j) einen SO<sub>2</sub>-Y-Rest darstellt, in dem Y
- (i) ein gegebenenfalls substituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl,
- (ii) ein gegebenenfalls substituiertes Aryl oder Heteroaryl bzw. O-Aryl oder O-Heteroaryl, oder
- (iii) -NR'R" ist, wobei R' und R" jeweils unabhängig
- 10 H oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl bedeuten,
- (k) einen cycloaliphatischen Ring mit 5 bis 8 C-Atomen darstellt, der gegebenenfalls substituiert ist,
- 15 (l) einen gegebenenfalls substituierten Heteroarylrest oder heterocycloaliphatischen Rest darstellt,
- (m) einen funktionalisierten Alkylrest der Formel -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X darstellt, wobei die Alkylkette unverzweigt oder verzweigt ist, n = 1 bis 8 bedeutet und der funktionelle Rest X
- 20 (i) eine Hydroxylgruppe darstellt, deren H-Atom gegebenenfalls durch eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-, Aralkyl-, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, Aryl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Hydroxyalkyl- oder Acylgruppe CO-Alkyl (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), substituiert ist,
- 25 (ii) ein Halogenatom bedeutet,
- (iii) eine tertiäre Aminogruppe der Formel -N(Alk)<sub>2</sub> darstellt, wobei die Alkylgruppen 1 bis 3 C-Atome besitzen und das Stickstoffatom gegebenenfalls einem heterocycloaliphatischen Ring mit
- 30

- 27 -

5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom, S  
tragen kann, angehört,

$R^2$  einen gegebenenfalls substituierten Phenylrest darstellt,

5

$R^3$  H oder verzweigtes bzw. unverzweigtes  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl ist und n  
0 oder 1 bedeutet.

10

oder von Salzen der Verbindungen zur Herstellung eines Mittels für  
die Diagnostik, Therapie und Prävention von Urokinase- oder Urokina-  
serezeptor-assoziierten Krankheiten.

2. Verwendung nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**

15

daß  $R^1$  eine Gruppe der Formeln (b), (d) und (f) ist,  $R^2$  einen 2,4,6-  
Triisopropylphenyl-Rest darstellt, und  $n=0$  ist.

3. Verwendung nach Ansprüchen 1 oder 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**

20

daß die Verbindung der Formel I  $N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfo-  
nyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid, das  
L-Enantiomer oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer der  
Verbindungen ist.

25

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**

daß die Verbindungen in Form von physiologisch verträglichen  
Säuresalzen, insbesondere als Hydrochloride, vorliegen.

30

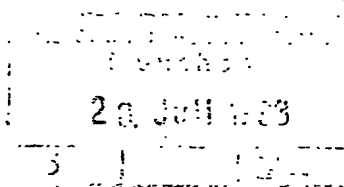
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Tumorbekämp-  
fung.

e6.80.01 M

- 28 -

6. Verwendung nach Anspruch 5 zur Bekämpfung von Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen und der Metastasenbildung.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Bekämpfung von Pemphigus vulgaris.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung von oral, topisch, rektal oder parenteral verabreichbaren Arzneimitteln.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen, wie Pflastern.
10. Verfahren zur Urokinasehemmung bei Lebewesen, insbesondere beim Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen Menge mindestens eines Urokinaseinhibitors nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
11.  $N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid, das L-Enantiomer davon oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer der Verbindungen.

- 29 -



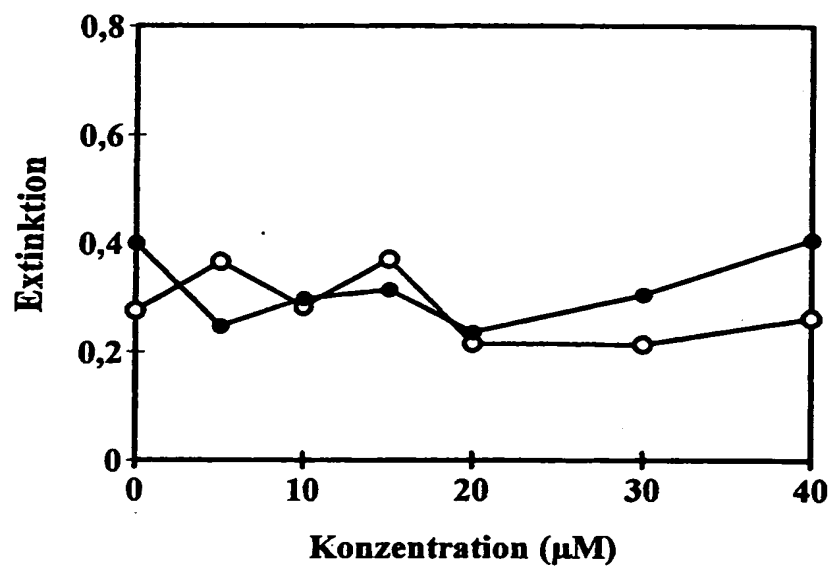
### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidino-phenyl-  
alanins als Urokinase-Inhibitoren zur Behandlung von malignen Tumoren und  
der Metastasierung.

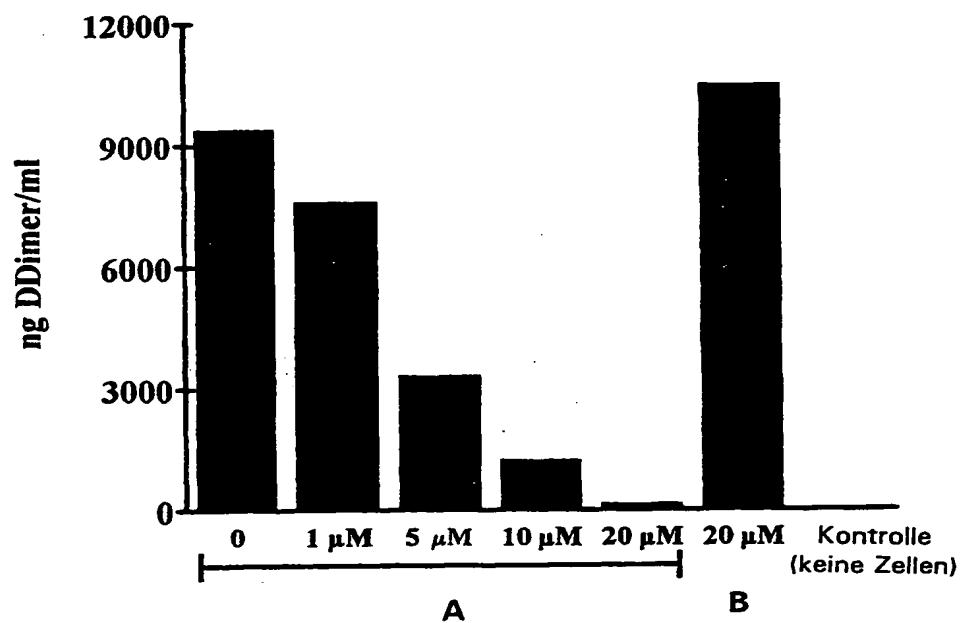
vo 20. Juli 1998



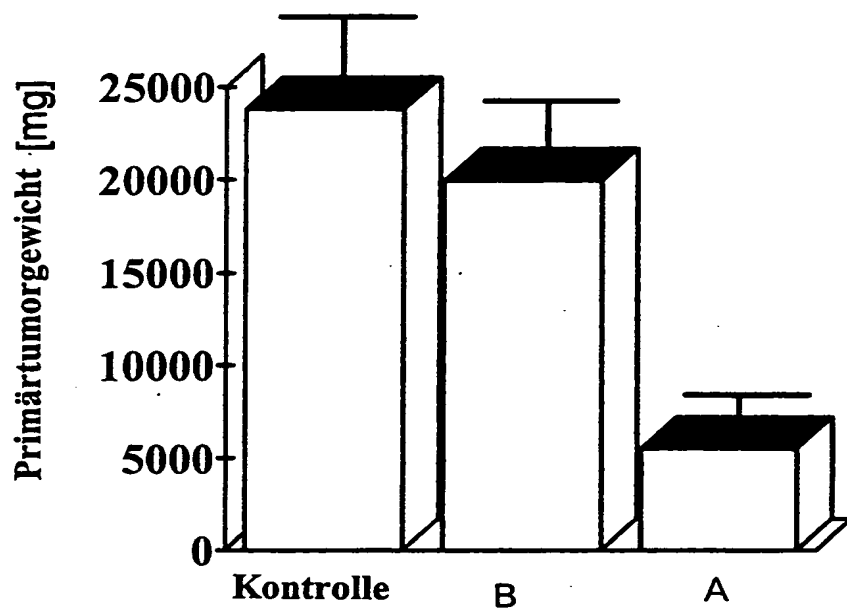
20. Juli 1998

**Figur 1:**

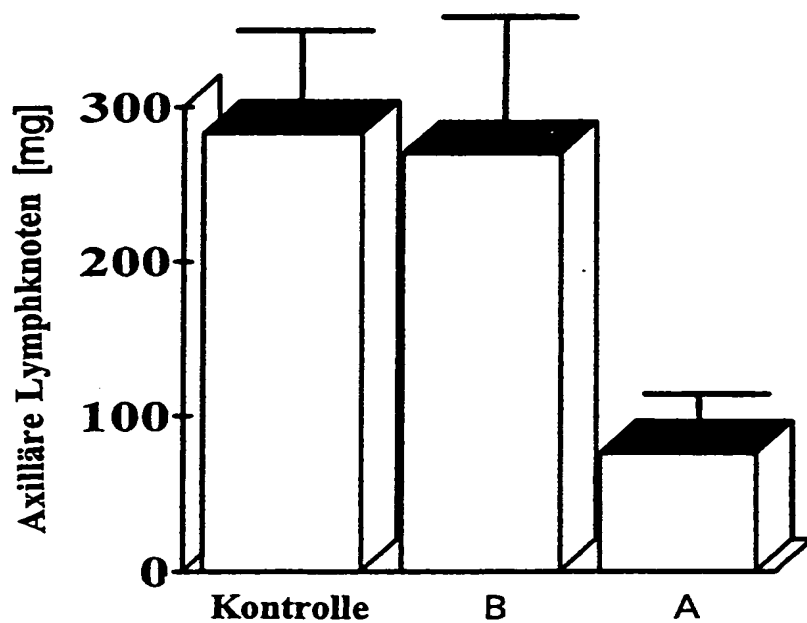
Figur 2:



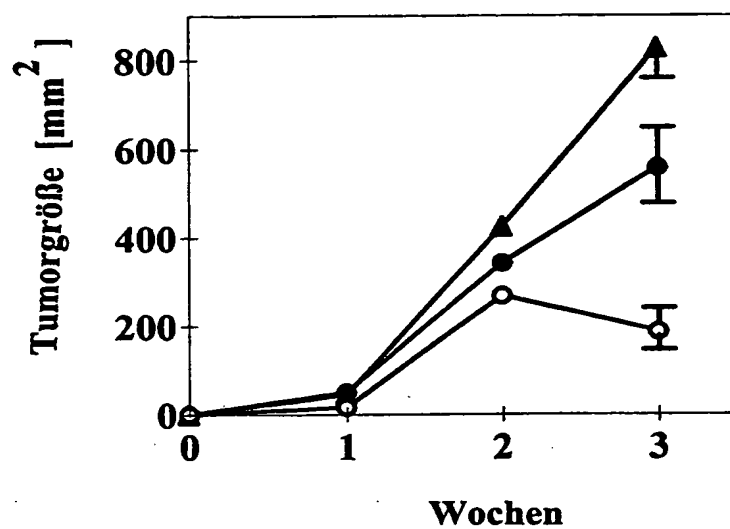
Figur 3:



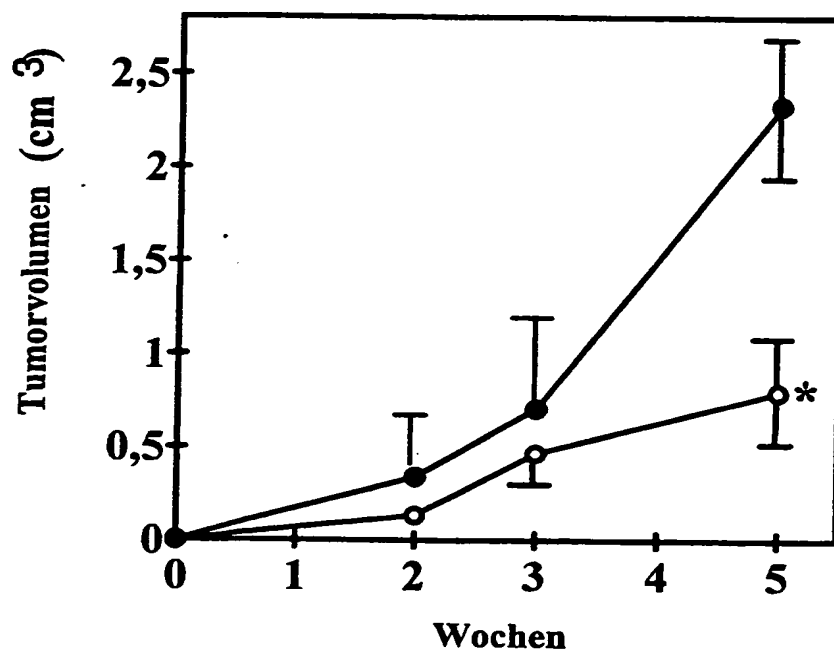
Figur 4:



Figur 5:



Figur 6:



\* p = 0,014